

# 不同品种、盐度及月份菊芋叶中绿原酸的含量测定<sup>\*</sup>

孙鹏程 苗 芹 李洪娟 刘苏静 夏传海<sup>†</sup>

(中国科学院海岸带生物学与生物资源利用所重点实验室,中国科学院烟台海岸带研究所,山东 烟台 264003)

**摘 要** 建立 HPLC 法测定菊芋叶中绿原酸含量的方法,对菊芋植株中不同部位绿原酸的分布规律,以及不同品系、盐度、采摘时间等因素对菊芋叶中绿原酸含量的影响情况进行研究。方法:色谱柱为 Hypersil BDS C-18(4.6×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流速为 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ,检测波长为 327 nm,进样量为 10  $\mu\text{L}$ ,柱温为 30℃,流动相为 0.1% 三氟乙酸水(A)-乙腈(B)。结果:菊芋叶中绿原酸的含量(3.40%)显著高于其他部位绿原酸的含量;10 月份菊芋叶中绿原酸的平均含量达最大值(2.74%)。南芋(N)受盐度影响较小,菊芋叶中绿原酸的平均含量(3.15%)明显高于莱芋(L)叶中绿原酸的平均含量(2.32%)。结论:菊芋植株中的绿原酸主要存在于菊芋叶中;不同采摘时间对菊芋叶中绿原酸的积累影响很大,10 月中旬可以作为菊芋叶的最佳采收时间;不同菊芋品种对盐度高低的适应能力不同,其中,南芋可能更适应在盐碱地土壤类型中生长。

**关键词** 菊芋;绿原酸;高效液相色谱

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)为菊科向日葵属多年生草本植物,俗称鬼子姜、洋姜、洋芋头等。菊芋原产于北美,适应环境能力较强,在我国多个省份,尤其山东、山西、江苏、黑龙江等地均有广泛种植。菊芋的抗逆性较强,能在盐碱地环境种植,可修复因石油开采、煤炭开采等严重破坏的土地资源等,能为人类带来巨大的经济效益、生态效益和社会效益<sup>[1,2]</sup>。

菊芋的地下块茎含有丰富的淀粉、氨基酸、蛋白质和果糖多聚物等物质,可以作为人类食品加工使用<sup>[3,4]</sup>;其地下块茎及地上茎叶可作为饲料供牲畜食用<sup>[5,6]</sup>。此外,传统医学认为菊芋具有轻便利尿、健胃滋补等作用,《中华本草》记录菊芋具有清热凉血、消肿等功效,可以用以治疗糖尿病、风湿病以及跌打损伤、骨折肿痛等疾病。现代医学研究证明菊芋除可用于治疗糖尿病等疾病外,还可用于预防肿瘤的发生<sup>[7,8]</sup>。因此,菊芋是一种极具开发和利用价值的经济作物。

根据报道,菊芋叶中富含丰富的绿原酸<sup>[9]</sup>。研究表明绿原酸具有非常广泛的生物活性,如抗菌、抗

病毒、抗肿瘤、抗氧化、降血糖、保肝利胆、消炎镇痛、清除自由基等<sup>[10-16]</sup>。目前,绿原酸已被广泛应用于食品、医疗、保健及日用化工等行业。

当前我国菊芋资源的总体利用率较低,除菊芋块茎可用于食品工业生产、部分菊芋茎叶可用于畜牧饲养外,绝大部分菊芋茎叶被直接的废弃,造成了菊芋资源的大量浪费。因此,深入开展菊芋茎叶有效成分的研究,有利于充分利用菊芋资源,对推动菊芋产品的全产业链发展具有重要意义。

本文采用 HPLC 法建立了检测和定量分析菊芋中绿原酸的方法,系统考查了菊芋不同采摘部位中绿原酸含量的差别,并研究了不同品种、不同盐度、不同采摘时间的菊芋叶中绿原酸含量的变化规律,为规模化生产及质量控制提供一套切实可行的检测手段,为菊芋叶的综合利用开辟了一条新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与设备

AL204-IC 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上

收稿日期:2015-07-03

<sup>\*</sup> 中国科学院“十三五”突破项目(Y254031011)和“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAC02B04)资助

<sup>†</sup> 通讯作者;E-mail: chxia@yic.ac.cn

作者简介:孙鹏程(1988—),男,硕士,主要从事耐盐植物高值化利用研究。E-mail: spc1155@126.com

海)有限公司);KQ5200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DF-101S 恒温磁力搅拌器(上海翔雅仪器设备有限公司);GZX-9140 MBE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);TD5A-WS 低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

绿原酸标准品(98%)购于上海晶纯试剂有限公司;色谱级甲醇、乙醇、三氟乙酸购于天津市科密欧化学试剂有限公司;分析纯甲醇购于国药集团化学试剂有限公司。

1.3 材料

用于建立绿原酸分析方法的菊芋叶样品及菊芋花、茎和块茎样品,于 2012 年 9 月中旬采于山东省烟台市当地农田;用于研究不同品种、不同盐度、不同采摘时间菊芋叶中绿原酸含量的变化规律的菊芋叶样品(见表 1),分别于 2012 年 7 月中旬、8 月中旬、9 月中旬、10 月中旬和 11 月中旬采于山东省东营市垦利县永安镇十九村南芋种质繁育基地,所有样品均经自然阴干、粉碎、过筛(40 目)后,于 25℃ 室温下避光存储,备用。

表 1 菊芋叶样品

Table 1 Samples of *Helianthus tuberosus* leaves

编号 No.	品种 Variety	盐度 Salinity
Lg-Y*	莱芋 Lai Yu	低盐 Low salinity
Lm-Y		中盐 Middle salinity
Ng-Y		低盐 Low salinity
Nm-Y	南芋 Nan Yu	中盐 Middle salinity

注: \* Y=7,8,9,10,11;即 Y 代表菊芋叶的不同采摘月份:7 月中旬,8 月中旬,9 月中旬,10 月中旬和 11 月中旬。

Note: \* Y=7, 8, 9, 10, 11; Y means the different picking months of *H. tuberosus* leaves; mid July, mid August, mid September, mid October and mid November.

1.4 色谱条件

色谱柱为 Hypersil BDS C-18 (4.6×250 mm, 5 μm);流速为 1 mL min<sup>-1</sup>;检测波长为 327 nm (2010 年版中国药典第二部);进样量为 10 μL;柱温为 30℃;流动相为 0.1% 三氟乙酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱,洗脱程序为 0~10 min,10% B;10~15 min,12% B;15~25 min,100% B,25~35 min,10% B。

1.5 绿原酸样品溶液的制备

精密称取菊芋叶样品 0.5 g 于 100 mL 圆底烧

瓶内,加入 50 mL 80% 的甲醇水溶液,80℃ 下加热回流提取 30 min,冷却至室温,补足失重,离心,取上清液,过 0.45 μm 滤膜,低温冷藏,作为样品溶液备用。

1.6 绿原酸标准溶液的制备

精密称取绿原酸标准品 15.72 mg 于 50 mL 棕色容量瓶内,加入适量 50% 甲醇水溶液溶解完全,定容,配制成浓度为 616.176 μg mL<sup>-1</sup> 的绿原酸标准溶液,低温冷藏,备用。

1.7 标准曲线的建立

精密量取适量上述绿原酸标准溶液 10 份,分别用 50% 甲醇稀释成浓度分别为 0.1978、0.3956、0.7912、1.5824、3.1648、6.3296、15.824、31.648、63.296、158.24 μg mL<sup>-1</sup> 的溶液,用上述色谱条件分析测定,以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.8 样品含量的测定

精密称取表 1 中用于定量分析的各样品 0.5 g,按照 1.5 节方法制备样品溶液,重复实验两次,HPLC 测定绿原酸峰面积,根据线性回归方程计算绿原酸浓度,并按照下述公式计算绿原酸含量:

$$X(\%) = \frac{C_0 \times V_0 \times 10^{-6}}{M_0} \times 100\%$$

其中, X 是绿原酸的百分含量(%), C<sub>0</sub> 是样品溶液中绿原酸的浓度(μg mL<sup>-1</sup>), V<sub>0</sub> 是样品溶液的体积(mL), M<sub>0</sub> 是菊芋叶样品的质量(g)。

2 结果与讨论

2.1 绿原酸的色谱分析

在 1.4 节的色谱条件下,所得绿原酸标准品和菊芋叶粗提物样品的色谱图如图 1 所示。绿原酸的保留时间为 10.3 min,在 327 nm 波长下有最大吸收,且绿原酸峰形尖锐、对称性较好、分辨率较高,适于做定量分析。

2.2 绿原酸的线性关系

根据 1.7 节方法建立绿原酸的标准曲线,以绿原酸的浓度为横坐标(x)、以积分峰面积为纵坐标(y),所得绿原酸的标准曲线如图 2 所示。结果表明,绿原酸在 2.5~123.2 μg mL<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系,其线性方程为: y = 29.9804x + 13.7436, R<sup>2</sup> = 0.9999。

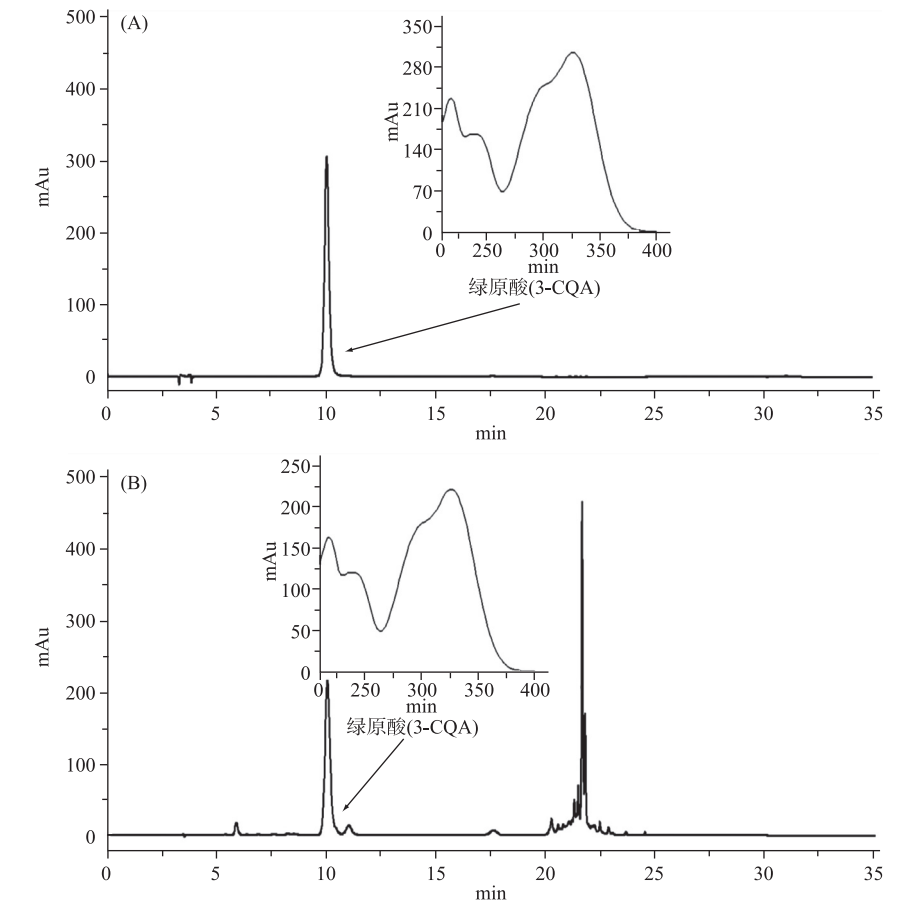


图 1 绿原酸标准品和菊芋叶粗提物的 HPLC 色谱图和 UV 光谱图 (A:标准品,B:样品)

Fig.1 HPLC chromatogram and UV spectrum (A: Standard sample of 3-CQA, B: The crude extract of *H. tuberosus* leaves)

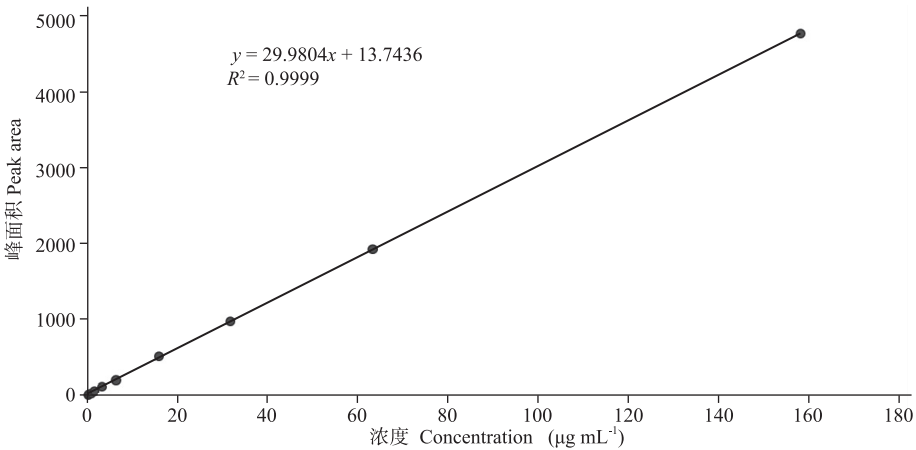


图 2 绿原酸的标准曲线

Fig.2 The standard curve of 3-CQA

2.3 精密度实验

取供试品溶液,按照既定色谱分析条件进样,连续进样 5 次,每次进样 10  $\mu\text{L}$ ,计算绿原酸的浓度,结果如表 2 所示,RSD 为 0.10%,表明仪器的精密度良好。

2.4 稳定性实验

取供试品溶液,按照既定色谱分析条件,每隔 2 h 测定一次,每次进样 10  $\mu\text{L}$ ,共测定 5 次,计算绿原酸的浓度,结果如表 3 所示,RSD 为 0.92%,表明绿原酸样品溶液 10 h 内稳定可靠。

表 2 精密度实验结果  
Table 2 Results of precision test

实验次数 Experiment times	1	2	3	4	5
绿原酸浓度 Concentrations of 3-CQA (μg mL <sup>-1</sup> )	199.26	199.40	199.72	199.63	199.35
平均值 Mean value (μg mL <sup>-1</sup> )			199.47		
RSD			0.10%		

表 3 稳定性实验结果  
Table 3 Results of stability test

实验次数 Experiment times	1	2	3	4	5
绿原酸浓度 Concentrations of 3-CQA (μg mL <sup>-1</sup> )	198.26	199.21	199.65	199.63	195.31
平均值 Mean value (μg mL <sup>-1</sup> )			198.41		
RSD			0.92%		

2.5 重现性实验

按照样品溶液制备方法配制溶液,平行 5 份,分别按照既定色谱条件进样一次,每次 10 μL,计算绿原酸的浓度,结果如表 4 所示,RSD 为 0.44%,表明本方法的重现性良好。

2.6 加样回收率实验

取已知含量的菊芋叶样品 0.2 g,精密称定 5 份,每份加入绿原酸标准品 2.54 mg,按 1.5 节样品溶液制备的方式制备溶液,进行液相色谱分析,每次进样 10 μL,计算绿原酸含量,结果如表 5 所示,得加样回收率为 99.24%,RSD 为 1.34%,表明该方法可靠。

表 4 重现性实验结果  
Table 4 Results of reproducibility test

实验次数 Experiment times	1	2	3	4	5
绿原酸浓度 Concentrations of 3-CQA (μg mL <sup>-1</sup> )	199.19	197.21	197.59	198.72	198.89
平均值 Mean value (μg mL <sup>-1</sup> )			198.32		
RSD			0.44%		

表 5 加样回收率实验结果  
Table 5 Results of recovery test

样品质量 Sample weight (g)	绿原酸含量 Contents of 3-CQA (mg)	理论量 Theoretical value (mg)	测出量 Determind value (mg)	回收率 Recovery rates (%)
0.2007	4.01	6.55	6.69	104.28
0.2005	4.00	6.54	6.47	95.85
0.2007	4.01	6.55	6.48	96.40
0.2003	4.00	6.54	6.57	100.18
0.2003	4.00	6.54	6.56	99.49
平均回收率 Average rate of recovery (%)		99.24		
RSD (%)		3.41		

2.7 样品含量的测定

按照 1.8 实验方法,得菊芋花、叶、茎、块茎中绿原酸的含量对比如图 3 所示,不同品种、盐度、月份菊芋叶中绿原酸含量对比如图 4 所示。

从图 3 可以看出,菊芋不同部位绿原酸含量的高低顺序依次为:叶>茎>花>块茎,其中菊芋叶中绿原酸的含量(3.40%)要显著高于其他部位绿原酸的含量。

另外,菊芋叶中绿原酸的积累量是不断变化的,不同品种、生境、采摘时间下菊芋叶中的绿原酸的含

量也是不同的。从图 4 可以看出,同一品种、同一盐度、不同采摘月份下,菊芋叶中绿原酸的含量均是先随月份的增加而不断积累,到 10 月份时绿原酸的平均含量达最大值(2.74%),而后 11 月份时绿原酸的含量急剧下降,平均含量达最小值(0.12%),较 10 月份降低了 95.6%。一般情况下,10 月份是菊芋块茎收获的季节,此时采摘菊芋叶片不仅不会影响菊芋块茎的收益,而且还会带来高额的附带价值,因此,我们建议菊芋叶片的最佳采收时间为 10 月中旬。对比 10 月份不同品种、不同盐度下菊芋叶中绿

原酸的含量,可以发现,Lm 中绿原酸的含量(3.74%)是 Lg 中绿原酸含量(0.90%)的 4.16 倍,Ng 中绿原酸的含量(3.32%)是 Nm 中绿原酸含量(2.99%)的 1.11 倍,说明同一品种菊芋叶中绿原酸的积累量受菊芋生境的影响不同。相对而言,南

芋(N)受盐度影响较小,菊芋叶中绿原酸的平均含量(3.15%)明显高于莱芋(L)叶中绿原酸的平均含量(2.32%),因此,综合考虑,南芋对环境适应能力较强,可用于盐碱地土壤改善和环境绿化。

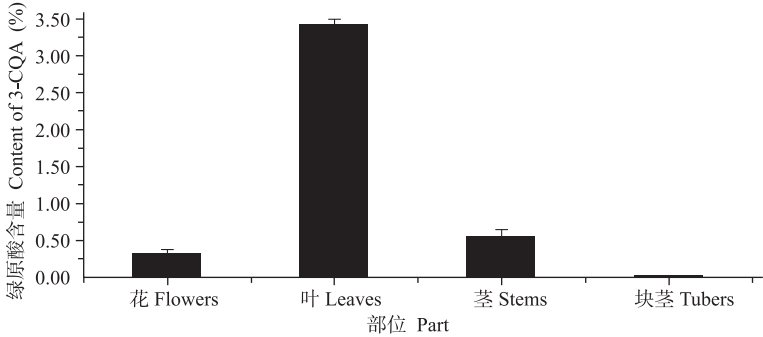


图3 菊芋不同采摘部位(花、叶、茎、块茎)中绿原酸的含量  
Fig.3 The contents of 3-CQA in different parts of *H. tuberosus*

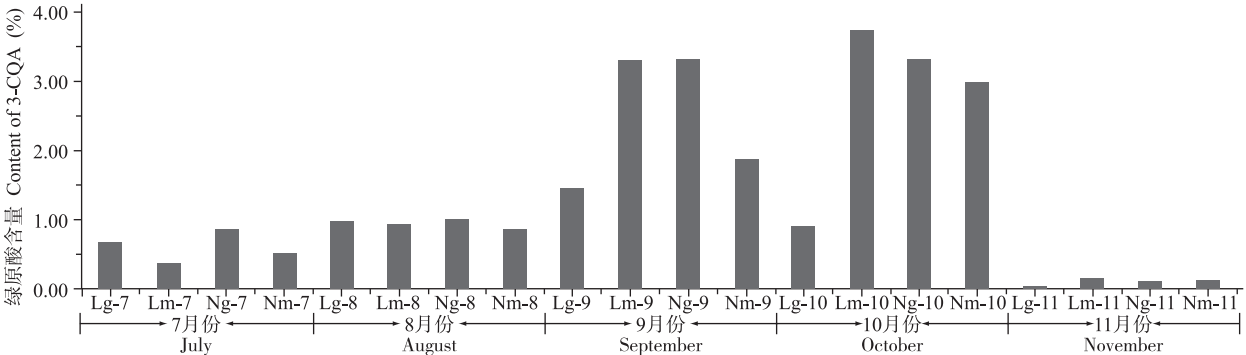


图4 不同品种、盐度、月份菊芋叶中绿原酸含量  
Fig.4 The contents of 3-CQA in the leaves of *H. tuberosus* in different varieties, salinity and months

3 结 论

(1) 本文建立了菊芋叶中绿原酸含量的定量分析方法,并通过精密度实验、稳定性实验、重现性实验和加样回收率实验进行方法学验证。结果表明,仪器的分离效能较高、精密度良好,样品溶液 10 h 内稳定可靠,可以满足绿原酸测定的时间要求,且本方法重现性良好,可以用于菊芋叶中绿原酸含量的定量分析测定。

(2) 研究了菊芋不同采摘部位(花、叶、茎和块茎)中绿原酸含量积累情况。结果表明,菊芋叶中绿原酸的含量要明显高于其他部位绿原酸的含量,因此,可以采用菊芋叶片作为制备绿原酸的原料。

(3) 不同采摘月份对菊芋叶中绿原酸的积累影响很大。对于山东东营市种植的菊芋,10 月中旬菊芋叶中绿原酸含量最高,达 3.5%,且此时为菊芋块

茎收获的季节,10 月中旬采摘菊芋叶片不仅不会影响菊芋块茎的丰收,还可以获取具有高附加值的绿原酸产品,具有很好的经济效益和社会效益。

(4) 不同菊芋品种对盐度高低的适应能力不同,致使菊芋叶中绿原酸的积累量变化较大。其中,山东东营地区种植的南芋对盐度高低的适应能力较强,菊芋叶中绿原酸的平均含量(3.15%)明显高于莱芋叶中绿原酸的平均含量(2.32%),综合考虑,南芋更适用于山东省盐碱地土壤改善和环境绿化。

参考文献

[1] Zhang J F. Principles and measures of ecologicalrehabilitation in saline soil. Beijing: China Forestry Publishing House, 2008

[2] Barsby R W J, Salan U, Knight D W, et al. Feverfew and vascular smooth muscle: extracts from fresh and dried plants show opposing pharmacological profiles, dependent upon sesquiterpene lactone content. *Planta Med.*, 1993, 59(1): 20-25

[3] Ma X Y, Zhang L H, Shao H B, et al. Jerusalem artichoke (*Helio-*



- anthus tuberosus*), a medicinal salt-resistant plant has high adaptability and multiple-use values. J. Med. Plants. Res., 2011 (8):1272-1279
- [4] Rakhimov D A, Arifkhodzhaev A O, Mezhlumyan L G, et al. Carbohydrates and proteins from *Helianthus tuberosus*. Chem. Nat. Compd., 2003, 39(3): 312-313
- [5] Long X H, Mehta S K, Liu Z P. Effect of  $\text{NO}_3^-$ -N enrichment on seawater stress tolerance of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). Pedosphere, 2008, 18(1): 113-123
- [6] Seiler G J, Campbell L G. Genetic variability for mineral element concentrations of wild Jerusalem artichoke forage. Crop Sci., 2004, 44(1): 289-292
- [7] Righetti L, Tassoni A, Bagni N. Polyamines content in plant derived food: A comparison between soybean and Jerusalem artichoke. Food Chem., 2008, 111(4): 852-856
- [8] Griffaut B, Debiton E, Madelmont J C, et al. Stressed Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) excrete a protein fraction with specific cytotoxicity on plant and animal tumour cell. BBA-Gen Subjects, 2007, 1770(9): 1324-1330
- [9] 袁晓艳, 高明哲, 王锴, 等. 高效液相色谱-质谱法分析菊芋叶中的绿原酸类化合物. 色谱, 2008, 3: 335-338. Yuan X Y, Gao M Z, Wang K, et al. Analysis of chlorogenic acids in *Helianthus tuberosus* Linn leaves using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Chin. J. Chromatogr., 2008, 3: 335-338
- [10] Zhao M, Wang H, Yang B, et al. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. Food Chem., 2010, 120(4): 1138-1142
- [11] Robinson W E, Cordeiro M, Abdel-Malek S, et al. Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. Mol. Pharmacol., 1996, 50(4): 846-855
- [12] Jiang Y, Kusama K, Satoh K, et al. Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. Phytomedicine, 2000, 7(6): 483-491
- [13] Bouayed J, Rammal H, Dicko A, et al. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. J. Neurol. Sci., 2007, 262(1): 77-84
- [14] Nicasio P, Aguilar-Santamaría L, Aranda E, et al. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. Phytother. Res., 2005, 19(8): 661-664
- [15] Hemmerle H, Burger H J, Below P, et al. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. J. Med. Chem., 1997, 40(2): 137-145
- [16] Dos Santos M D, Almeida M C, Lopes N P, et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. Biol. Pharm. Bull., 2006, 29(11): 2236

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF CHLOROGENIC ACID IN *HELIANTHUS TUBEROSUS* LEAVES WITH DIFFERENT VARIETIES, SALINITY AND COLLECTING TIME

Sun Pengcheng Miao Qin Li Hongjuan Liu Sujing Xia Chuanhai<sup>†</sup>

(Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resources Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

**Abstract** To establish the quantitative analysis method of 3-CQA in *H. tuberosus* leaves by using high performance liquid chromatography (HPLC); To investigate the distribution of 3-CQA in the different parts of *H. tuberosus* and the influence of varieties, salinity, collecting time on 3-CQA content in *H. tuberosus* leaves. Methods: the detecting conditions were listed as follows: column: Hypersil BDS C-18 (4.6×250 mm, 5 μm); flow rate: 1 mL min<sup>-1</sup>; detection wavelength: 327 nm; injection volume: 10 μL; column temperature: 30℃; mobile phase: 0.1% trifluoroacetic acid in redistilled water (A) and acetonitrile (B). Results: the content of 3-CQA (3.40%) in *H. tuberosus* leaves was significantly higher than those in other parts; The average content of 3-CQA in *H. tuberosus* leaves reached the maximum value (2.74%) in October. The average content (3.15%) of chlorogenic acid in the leaves of Nan Yu was significantly higher than that (2.32%) in Lai Yu. Conclusions: the content of 3-CQA in *H. tuberosus* leaves was the highest. Collecting time existed great influence on the content of 3-CQA in *H. tuberosus* leaves, and mid October could be chosen as the most suitable time to collect *H. tuberosus* leaves. Different cultivars of *H. tuberosus* showed different salinity tolerance. Nan Yu might be the more suitable cultivar that adapted well to salt-alkaline soils type.

**Key words** *Helianthus tuberosus* L.; Chlorogenic acid; High performance liquid chromatography